



Petra Žáková,
technická
pracovnice



**Ing. Peter
Makovický, PhD.,**
odborný pracovník

Záchyt spinocerebelární ataxie u *ATP1B2* heterozygotních Malinois štěňat: Kolik našich chovných Belgických ovčáků je přenašečů neurodegenerativních onemocnění?

P. ŽÁKOVÁ¹, P. MAKOVICKÝ²

¹Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Praha, Česká republika

²Laboratórium veterinárnej histopatológie v Komárne, Slovenská republika

SOUHRN

Žáková P., Makovický P. **Záchyt spinocerebelární ataxie u *ATP1B2* heterozygotních Malinois štěňat: Kolik našich chovných Belgických ovčáků je přenašečů neurodegenerativních onemocnění?**

Veterinářství 2021;71(1):17-23.

Spongiózní cerebelární degenerace s cerebelární ataxií (SDCA) je dědičné neurodegenerativní onemocnění s predispozičním výskytem u plemene Belgický ovčák – Malinois. V pozadí neurologické symptomatologie stojí degenerace mozečku. Zde referujeme případ vrhu devíti štěňat, z kterých tři štěňata byla homozygotní pro mutaci v *ATP1B2* genu, pět bylo identifikováno jako *ATP1B2* heterozygotů a jedno bez mutace *ATP1B2* genu. Všechna štěňata byla bez mutace v *KCNJ10* genu. Homozygoti se projeví klasickou symptomatologií. U tří z pěti *ATP1B2* heterozygotů se ve věku od sedmi týdnů začaly generalizovat projevy nemoci, které se nápadně podobaly průjevům homozygotních sourozenců. Všechna tři štěňata byla eutanazována. Byla provedena pitva s odběrem vzorků pro účely histopatologického vyšetření. Pitva prokázala změny konzistence kostní tkáně, hypertrofii ledvin a zvětšení axilárních, mediastinálních a mezenterálních lymfatických uzlin. V histologickém nálezu dominují změny v mozečku, páteřní míše, periferních nervů a kosterních svalů. Jde o degeneraci Purkyňových buněk mozečku, degeneraci nervových buněk v páteřní míše s doprovodnými histologickými změnami nervových vláken periferních nervů se známky axonolýzy, zahrnující fokální nekrózy a regeneraci svalových vláken vřeten a svalových vláken kosterních svalů. Výsledky pitvy a histologie korespondují s anamnesticky udávanými projevy neurodegenerativního onemocnění spinocerebelární ataxie. V případě pozorování neurologické symptomatologie se u predisponovaných plemen psů doporučuje odborné veterinární a chovatelské veřejnosti provést testy na důkaz mutace v genech odpovědných za vývoj SDCA. Je vhodné uvažovat o rozšíření testování chovných psů na mutace v dalších genech, které jsou odpovědné za vývoj neurodegenerativních nemocí, včetně vývoje spinocerebelární ataxie. Námí uvedený případ dokumentuje, že část našich chovných Belgických ovčáků varianty Malinois jsou přenašeči neurodegenerativních onemocnění s dosud neobjasněným genetickým podkladem.

SUMMARY

Žáková P., Makovický P. **Detection of spinocerebellar ataxia in *ATP1B2* heterozygous Malinois puppies: How many of our breeding Belgian Shepherds are carriers of neurodegenerative diseases?**

Veterinářství 2021;71(1): 17-23.

Spongiuous Cerebellar Degeneration with Cerebellar Ataxia (SDCA) is a hereditary neurodegenerative disease with the predisposition to occur in the breed of Belgian Shepherd Malinois. Behind the neurological symptomatology is a cerebellar degeneration. We refer the case of the litter of nine puppies. Three puppies were homozygous for the mutation in *ATP1B2* gene, five of them were identified as *ATP1B2* heterozygotes and one with no mutation of *ATP1B2* gene. All puppies were without mutation in the *KCNJ10* gene. Homozygotes showed up by classic symptomatology. In three out of five *ATP1B2* heterozygotes from the

age of seven weeks, the manifestation of neurodegenerative disease started to appear. It was strikingly similar to the manifestation in their homozygous siblings. All three were euthanased. An autopsy with sampling for histopathological examination was performed. The results of the autopsy were changes in consistency of bone tissue, kidney hypertrophy and an enlargement of axillary, mediastinal and mesenteric lymph nodes. The histological finding is dominated by changes in the cerebellum, spinal cord, peripheral nerves and skeletal muscles. The degeneration of cerebellar Purkinje cells and degeneration of nerve cells in spinal cord are accompanied by histological changes in the peripheral nerve processes with signs of axonolysis, including focal muscular spindles fibers, skeletal muscles muscular fibers regeneration. The results of the autopsy and histology correspond to the medical history of neurodegenerative disease of spinocerebellar ataxia. In the case of observation of neurological symptomatology, it is recommended for the veterinary and breeders to test for mutation in genes responsible for the development of SDCA in the predisposed dog breeds. In addition, it is appropriate to consider extending the testing of breeding dogs for mutations in other genes that are responsible for the development of neurodegenerative diseases, including the development of spinal-cerebellar ataxia. Our case documents that part of our Belgian Shepherds Malinois dogs are carriers of neurodegenerative diseases with an yet unexplained genetic basis.

Úvod

Neurodegenerativní onemocnění se ve veterinární praxi obvykle projevují pestřejší symptomatologií s nástupem příznaků v různém věku zvířat a následným dramatickým průběhem. Jedná se o heterogenní skupinu onemocnění, která jsou dlouhodobě v centru zájmu základního neurobiologického i aplikovaného výzkumu. Jelikož jsou tato onemocnění dědičná, je přirozené, že se dostala i do pozornosti širší chovatelské veřejnosti. Spongiózní cerebelární degenerace s cerebelární ataxií (SDCA) je dědičné neurodegenerativní onemocnění, s predispozičním výskytem u plemene Belgický ovčák – varianty Malinois, částečně u varianty Tervueren, ale i u některých linií plemene Holandský ovčák. Jedná se o degeneraci mozečku, která se již v mladém věku štěňat projevuje neurologickou symptomatologií a končí fatálně. V roce 2011 byl na podkladu 13-ti štěňat Malinois s cerebelární ataxií vysloven předpoklad, že onemocnění má genetický základ.¹ V roce 2017 byly již konkrétně zdokumentované vztahy mezi SDCA a mutací genu *KCNJ10* – označované jako SDCA subtyp 1.² V krátkém časovém intervalu byla nalezena mutace v genu *ATP1B2* zodpovědná za vznik SDCA a mutací genu *ATP1B2* – označené jako SDCA subtyp 2.³ I když v pozadí jednotlivých forem onemocnění jsou dva různé geny, výklad patofyziologie zůstává založený na narušení homeostázy draslíku. Vysoká koncentrace draslíku v extracelulárních prostorech se projevuje ve funkci CNS. Význam draslíku v činnosti buňky je nezpochybnitelný s impaktem na koncentrační gradient, přičemž v případě hyperkalémie dochází k narušení klidového membránového potenciálu buňky s hyperexcitabilitou neuronů, což se projevuje změnami v signalizaci neuronů a následnou poruchou činnosti neuronů. Klinicky se nemoc projevuje neschopností udržet rovnováhu v průběhu běžné chůze s pravidelným propadáváním v běhu, nesystematickým padáním do stran, zahrnujícím křečovitě

stahy. Plně vyvinutý obraz se obvykle manifestuje mezi čtvrtým až osmým týdnem věku štěňat. Onemocnění se dědí autozomálně recesivně. Nemoc se projevuje jen u jedinců, kteří jsou nositeli mutace v homozygotní formě. Pokud je jedinec nositelem mutace v heterozygotní formě, klinické příznaky se u něj neprojevují, ale stává se přenašečem mutace genu. Vzhledem k těmto skutečnostem je v České republice, eventuálně i na Slovensku, onemocnění v pozornosti chovatelů plemene Belgický ovčák – Malinois, které je dnes již celosvětově dobře známo jako velice učenlivé, temperamentní, inteligentní a fyzicky zdatné plemeno psů. V zájmu odhalit přenašeče a předejít ztrátám v chovu, je v chovatelské praxi před výběrem chovných jedinců vhodné provést test na odhalení mutace uvedených genů. Na různých internetových portálech jsou volně zpřístupněny statistiky výskytu onemocnění, přičemž je uvedeno, že genetickým testováním bylo v České republice zachyceno 10 % přenašečů mutace *KCNJ10* genu a 8 % přenašečů mutace *ATP1B2* genu (Genomia, Česká republika). Jiná laboratoř uvádí 9 % přenašečů mutace *KCNJ10* genu a 12 % přenašečů mutace *ATP1B2* genu (Laboklin Czech, Česká republika). Mimo to je uvedeno, že v populaci se vyskytují psi se stejnými klinickými příznaky jako SDCA, ale bez mutace v genech *KCNJ10*, *ATP1B2*, z čeho se odvozuje, že v budoucnu bude zřejmě nalezena další mutace odpovědná za SDCA. Přenašeči se jinak projevují jako klinicky zdraví jedinci, bez klasické neurologické symptomatologie. V našem příspěvku uvádíme případ vrhu devíti štěňat, z kterých tři byla *ATP1B2* homozygotní, pět bylo identifikováno jako *ATP1B2* přenašeči (heterozygotní) a jedno bez mutace *ATP1B2* genu. Všechna štěňata byla bez mutace v *KCNJ10* genu. Homozygoti se projevili klasickou symptomatologií, ale neočekávaně tři z pěti *ATP1B2* přenašečů začali ve věku sedmi týdnů projevovat neurologické symptomy, které nápadně imitovaly symptomy homozygotních

sourozenců. Uvedená symptomatologie nebyla dle našich vědomostí dosud u heterozygotů popsána. Proto je cílem našeho krátkého sdělení, upozornit odbornou veterinární veřejnost, na nebezpečí projevů SCDA symptomatologie také u heterozygotů mutace v *ATP1B2* genu. V případě pozorování podobné symptomatologie u predisponovaných plemen doporučujeme provést testy na důkaz mutace v genech zodpovědných za vývoj SDCA. Do budoucna považujeme za vhodné uvažovat o rozšíření testování našich chovných psů i na mutace v dalších genech, které jsou odpovědné za vývoj spinální-cerebelární ataxie.

Materiál a metodika

Popis případu

Chovatelka a majitelka chovné feny plemene Belgický ovčák – Malinois vybrala k nakrytí psa, který jí byl v dobré vůli doporučen. Jednalo se o druhý vrh feny. Zabřeznutí, včetně porodu proběhlo bez zvláštností, přičemž ve vrhu bylo devět štěňat, která se klinicky projevovovala jako zdravá. Po dosažení jednoho měsíce věku, se u tří začaly v nepravidelných intervalech projevovat nepřírozené, mimovolné, svalové stahy, které přecházely do několika sekundových spazmů svalstva různých částí těla a končily pasivním povalením štěňat na bok, s následnou několika sekundovou, až několika-minutovou neschopností postavit se na končetiny, eventuálně i úplnou neschopností pohybu. Po překonání uvedeného stavu byla štěňata opět schopna běžného pohybu. V dalších dnech nabíraly spazmy na intenzitě, se zvyšující se frekvencí opakování za den. U jednoho štěněte neustupovaly křečovitě stavy ani po upadnutí do pasivní polohy a pokračovaly nekoordinovanými svalovými stahy, které imitovaly epileptické záchvaty. U jiného štěněte došlo ke spontánní zlomenině pravé holenní kosti. Postupně všechna tři štěňata úplně ztratila orientaci a nekoordinovaně, v nepravidelně se střídajících intervalech jen přepadávala z boku na bok a následně upadala do pasivních poloh. Jindy nedokázala ani sedět a buď se převálila na bok, nebo jen upadla na hřbet. Nebyla schopna se nakrmit a v pátém týdnu života byla eutanazována. Ve snaze odhalit příčiny projevů, eventuálně zjistit zda se jedná o vrozené onemocnění, byla odebrána krev, která byla odeslána na genetické vyšetření, včetně testování mutace genů: *KCNJ10* a *ATP1B2*. Doručené výsledky dokumentují homozygotní mutaci v genu *ATP1B2* (*ATP1B2:c.130_131ins227*) u třech výše uvedených štěňat, zbývajících pět štěňat z vrhu je přenašečem mutace v *ATP1B2* genu a jedno je negativní. Ani u jednoho z testovaných nebyla zjištěna mutace v *KCNJ10* genu. V následujících dnech se pět štěňat projevovovalo jako klinicky zdravých. U tří přenašečů mutace v *ATP1B2* však dochází, ve věku sedmi do devíti týdnů k nástupu spontánních, nespecifických svalových záškubů, které přecházejí do mimovolných spazmů a obtíží v průběhu běhu, s následnou progresí projevů do symptomatologie nápadně shodnou s výše uvedenými třemi *ATP1B2* homozygoty (obr. 1). Postupně



Obr. 1 – Pohled na jedno ze tří štěňat před eutanazií

dochází k exacerbaci se stupňováním symptomatologie, která ve finále vyúsťuje do obrazu téměř totální pasivity s doprovodnými bolestmi. Ve věku deseti týdnů byla tato tři štěňata eutanazována a byla provedena pitva s odběrem vzorků na histologické vyšetření. Zbývající dva *ATP1B2* přenašeči a jeden zdravý jedinec nevykazují uvedenou symptomatologii a klinicky se jeví jako zdraví.

Genetické vyšetření

Genetické vyšetření bylo realizované na náklady chovatelky psa komerční laboratoří (Genomia, Česká republika), která má na uvedené metodiky vypracované standardní operační postupy (SOP). Do laboratoře byla zaslána krev a materiál byl zpracován metodou přímé sekvenování DNA s cílovou mutací *c.986T>C KCNJ10* genu a ASA-PCR s cílovou mutací *c.130_131ins227 ATP1B2* genu.

Pitva, odběr vzorků a zpracování vzorků

Do čtyř hodin po eutanazii byla provedena pitva uvedených tří štěňat i s odběrem vzorků: jazyk (*corpus jazyka*), játra (*lobus hepatis dx. medialis*), bránice (svalová část), srdeční svalovina (*atrium sin., ventriculus dx.*), plíce (*lobus cranialis*), štítná žláza, ledvina, kosterní svaly (*m. triceps brachii medialis, m. extensor digitorum ulnaris, m. trapezius, m. gluteus medius, m. biceps femoris superficialis head, m. semimembraneosus, m. tibialis cranialis*: všechny vzorky z pravé strany těla ze středu svalů), periferní nervy (*n. medialis, n. femoralis*: všechny vzorky z pravé strany těla), páteřní mícha (C3–C4), mozek (vzorek z frontálního laloku obsahující kortex a medulu), mozeček (vzorky z jednotlivých lobulů) a nakonec levé a pravé oko. Vzorky byly po dobu 24 hodin fixovány v 10% roztoku formalínu, dále uloženy v 70% roztoku etanolu a následně zpracovány standardní histologickou metodikou a zalité do parafinových bločků. Vzorky byly nakrájeny na rotačním mikrotomu o tloušťce 3 až 5 μm a barvené přehledným barvením hematoxylinem-eosinem (HE). Preparáty byly vyhodnoceny v obraze světelného mikroskopu.

Výsledky

Pitevní závěry

Jde o dobře vyvinutá těla tří štěňat, která jsou kompletně osrstěná, vzhledem, váhou, výživou i svalstvem odpovídající věku (obr. 2A, B, C, D, E, F). U jednoho štěněte došlo v průběhu vnější prohlídky těla při přirozené manipulaci pravé pánevní končetiny k úplnému oddělení stehenní kosti s nálezem fraktury. Při pitvě u všech tří štěňat dominoval nález změkklých kostí, se střídající se pevností jednotlivých žebér na pohyby a tlak ostří nože, v průběhu otevírání hrudního koše. Hypertrofie ledvin. Zmnožení a zvětšení axilárních, mediastinálních a mezenterálních lymfatických uzlin. Při otevírání lebeční dutiny se kosti poměrně lehce krájely, místy byly citlivé i na tlak prstů a protlačovaly se do lebeční dutiny se spongiózní konzistencí na řezu, bez jednoznačných deformit v tvaru lebky. Mozky nevykazovaly jednoznačné změny v anatomii (obr. 3A, B, C).

Histopatologické závěry

Jsou uvedeny pouze nálezy, kde byly přítomny změny.

Játra: standardně uspořádaná játra s ojedinělými miniaturními uzlíky se shluky makrofágů.

Bránice: v podélném řezu normální svalová vlákna kosterních svalů a individuální lehce nafouklá do tmavě červena zbarvená svalová vlákna, se ztrátou příčného pruhování, bez viditelnosti jader.

Plíce: izolované, variabilně velké perivaskulární a peribronchiální kulatěbuněčné zánětlivé infiltráty.

Ledvina: V kortexu početné, velikostí a tvarem podobné glomeruly (50>), s místy lehce rozšířeným močovým prostorem, s obsahem částečně vysráženého, vločkovitého se materiálu, s přítomností narůžovělých sférických formací, imitující známky proteinurie. Ojediněle přítomné scvrknuté glomeruly (<5%) se svráštěným mesangiem. V kontaktu početné tubuly, s iniciálními známkami postmortálních změn a v jednom případě v medulární části v kanálcích zachycen vysrážený tmavý nekrotický, až krystalizující materiál.

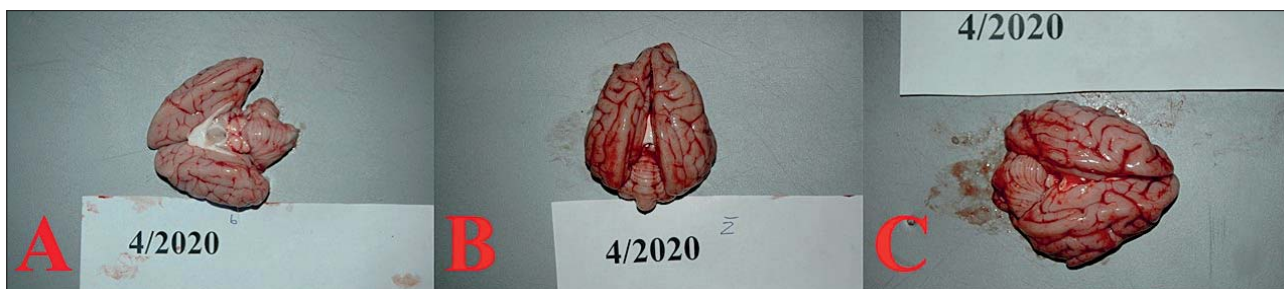
m. triceps brachii medialis: vzhledově normální svalová vlákna s menšími, izolovanými, kulatěbuněčnými, zánětlivými infiltráty.

m. trapezius, *m. gluteus medius*, *m. biceps femoris superficialis head*, *m. semimembraneosus*, *m. tibialis cranialis*: podélný i příčný řez svalových vláken kosterních svalů, včetně přítomnosti periferních nervů, s individuální ložiskovou fúzí nervových vláken (obr. 8a). Histologicky viditelná místa, které jsou tvořena skupinkami regenerujících se svalových vláken včetně regenerujících se svalových vláken kosterních svalů s částečně zachovalým příčným pruhováním, s několika centrálně lokalizovanými tmavými jádry (obr. 8b, D, E, F, G, H, I).

n. medialis: podélně i příčně přeříznuté periferní nervy, které jsou obalené silnější vrstvou hustého neuspořádaného kolagenního vaziva, kontinuální vrstvou epineuria,



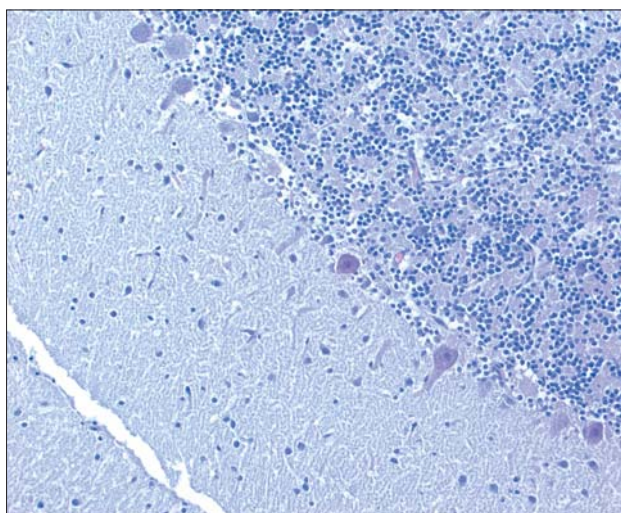
Obr. 2 – Těla jednotlivých psů po eutanazii (A, B, C) a pohled na orgány po otevření hrudní a břišní dutiny (D, E, F)



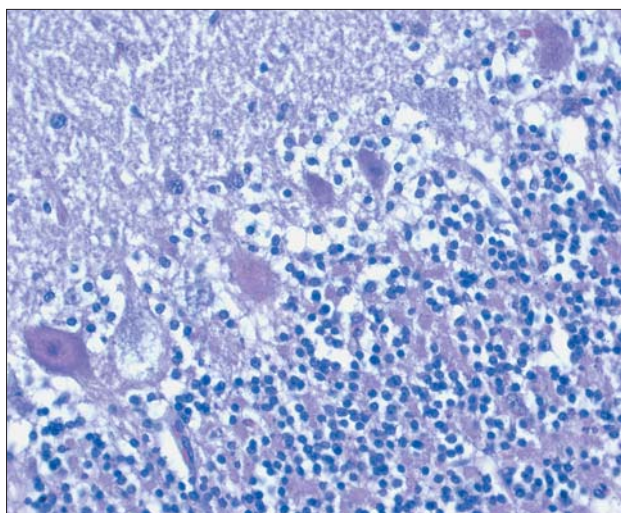
Obr. 3 – Obrázek zachycuje individuální pohled na mozky tří štěňat (A, B, C)

septy perineuria a jednotlivými nervovými vlákny, z kterých je část v izolovaných úsecích lehce fragmentovaná s něco minimem serózním, šedým materiálem, eventuálně jen nafouklými, opticky prázdnými myelinovými pochvami s individuálními natrávenými, až rozpuštěnými axony charakteru axonolýzy (obr. 8a).

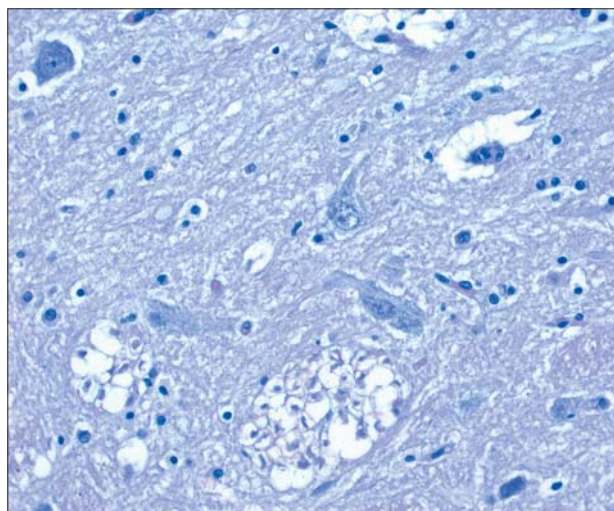
Páteřní mícha: příčný řez míchou s dobře viditelnou, centrálně lokalizovanou šedou hmotou a periferně lokalizovanou bílou hmotou. Šedá hmota je tvořena neurony s lehkými disproporčními rozdíly ve velikosti s polygonální až vřetenovitou cytoplazmou a jedním ovoidním jádrem, eventuálně i bez viditelnosti jádra. V celém materiálu, a zvláště v obou míšních rozích jsou viditelné lehce natrávené až nekrotické neurony a v kontaktu zvýrazněné výběžky, s přerušovanými kratšími tmavě zbarvenými kondenzovanými úseky. Místa disproporčně rozptýlené miniaturní buňky charakteru Gliových buněk, včetně početných miniaturních reparačních uzlíků. Z místa na místo na hrudkujícím se podkladu viditelné natrávené úseky šedé hmoty se zůstatkovými semivitálními buňkami (obr. 6, 7). Bílá



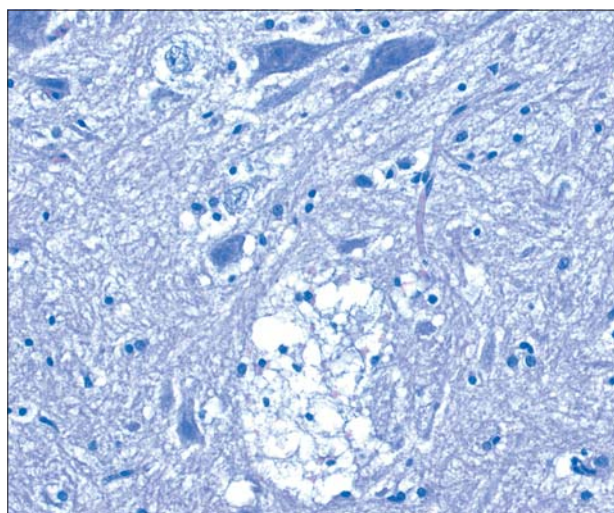
Obr. 4 – Mozeček s lehce prořídnutou vrstvou Purkyňových buněk. Legenda: HE: 200x



Obr. 5 – Několik semivitálních Purkyňových buněk v kontaktu s granulárními buňkami mozečku. Legenda: HE: 400x



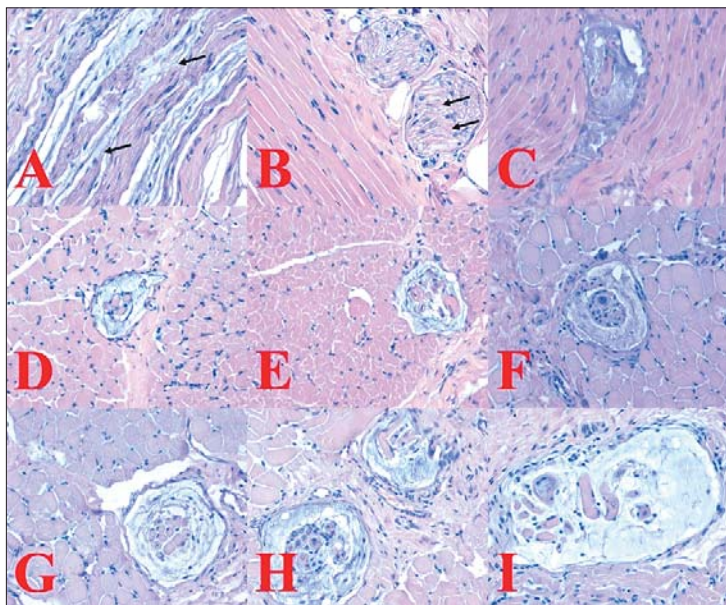
Obr. 6 – Část šedé hmoty páteřní míchy s natráveným hrudkujícím se podkladem. Legenda: HE: 400x



Obr. 7 – Natrávené úseky šedé hmoty se zůstatkovými semivitálními buňkami. Legenda: HE: 400x

hmota je tvořena početnými myelinizovanými vlákny, včetně přítomnosti úseků, které jsou tvořené serózním šedým materiálem.

Mozeček: v několika řezech zachycena členitá struktura mozečku s povrchově viditelnými, potrhanými mozkovými plenami i se sporadickým zmnožením kulatěbuněčných elementů, imitující tvorbu reparačních uzlíků. Molekulární vrstva je tvořena disperzně rozptýlenými miniaturními buňkami. Vrstva Purkyňových buněk je místy lehce, místy viditelně prořídla se skupinkami natrávených až semivitálních buněk zahrnujících individuální nekrotické buňky (obr. 4, 5). Granulózní vrstva kalibrem lehce varíruje a je tvořena populací miniaturních, velikostí i tvarem podobných buněk, včetně přítomnosti ojedinělých lehce vakuolizovaných buněk. Bílá hmota je tvořena nervovými vlákny s úsekovou kondenzací axonů. V několika řezech jsou na spodině mozečku přítomny variabilně veliké, tvarem vřetenovité až polygonální nervové buňky a v kontaktu zvýrazněné výběžky, které jsou tvořené kratšími tmavě zbarvenými kondenzovanými úseky.



Obr. – 4a: podélný řez periferním nervem (n. medialis) se skupinkami lehce natrávených, splývavých nervových vláken (černé šípky). Legenda: HE: 400x.
 b: řez kosterním svailem s dvěma periferními nervy s několika lehce nafouklými, částečně i splývavými výběžky nervových vláken (černé šípky). Legenda: HE: 400x.
 C, D, E, F, G, H, I: průřez kosterním svailem s variabilně velikými ohraničenými úseky, které jsou tvořené individuálními regenerujícími svalovými vlákny svalových vřeten a regenerujícími svalovými vlákny kosterních svalů. Legenda: HE: 400x.

Oči: vzhledově normální oči, včetně přítomnosti úsekově zachyceného normálního optického nervu. Po periférii okohybné svaly a v septech zachycené periferní nervy, s ojediněle se hrudkujícími nervovými výběžky.

Diskuze

Dědičné ataxie představují širší skupinu onemocnění zasahujících mozeček a míchu. Neurodegenerativní onemocnění mozečku, která jsou zapříčiněna lysozomálními defekty, neuroaxonomálními dystrofiemi zahrnujícími spongiózní degeneraci mozečku, jsou zařazena jako samostatné kategorie.⁴ Rostoucí prokazatelnost mezi mutacemi ve vybraných genech a patologií naznačuje, že klasifikační parametry jednotlivých klinických entit se budou muset časem měnit i ve veterinární medicíně.^{5,6} Použitím metodiky CRISPR-Cas se na modelu laboratorních myší potvrdilo, že mutace v jednotlivých genech se opakovaně projeví stejnými histologickými změnami v konkrétních orgánech.⁷ Tyto a jiné praktické příklady dokumentují, že genetický screening by v budoucnosti měl být ve veterinární diagnostice rutinně využíván.^{8,9} SDCA je dobře známa především v kruzích odborné veřejnosti zabývající se chovem Belgického ovčáka varianty Malinois. První případy tohoto onemocnění byly zaznamenány v roce 2011. Poruchy koordinace pohybů štěňat s poměrně rychlým progresivním vývojem patří mezi hlavní znaky onemocnění. Diagnóza se opírá o průkaz mutací ve výše zmíněných genech. U homozygot-

ních nositelů mutace se příznaky krátce po nástupu plně rozvinou se špatnou prognózou. Onemocnění je v současnosti neléčitelné a u diagnostikovaných psů se provádí eutanazie. Je přitom zřejmé, že přenašeči mutace genu obou variant SDCA jsou v populaci Malinois přítomni po celém světě. Není, ale vůbec jednoznačné jaké je procento heterozygotů z celkové populace chovných psů. Například v Španělsku byl v roce 2012 zachycen první případ SDCA u Malinois štěňat. Autoři doporučují spustit cílený program vyhledávání přenašečů mutací jednotlivých genů odpovědných za vývoj SDCA.¹⁰ Vědecká literatura je přitom poměrně skoupá na informace ohledně SDCA. Zvláště dobře jsou známe v úvodu citované články, na které se pak útržkovitě odvolávají další privátní společnosti s portfoliem těchto testů. Majitelé psů si je často dávají dělat na vlastní žádost. Pro další reprodukci jedinců je totiž nezbytné splnit podmínky, které určuje chovatelský řád. Ten zahrnuje povinné zdravotní vyšetření, které mnoho chovatelů rozšiřuje o další testování, jakým je například i genetický test mutací spojených se vznikem SDCA. Praxe však ukázala, že v některých SDCA-1, SDCA-2 negativních případech se projevují příznaky nápadně shodné s SDCA. Z toho nám tedy vyplývá, že za samotným onemocněním stojí mutace v dalších dosud neodhalených genech. Zdá se, že zvláště rodiče, kteří jsou přenašeči mutace v jednom z genů odpovědných za SDCA by mohli být přenašeči mutací v jiných genech, které jsou zodpovědné za rozvoj neurologické symptomatologie. V naší práci bylo pět štěňat přenašeči mutace v *ATP1B2* genu a z toho u tří došlo k rozvoji neurodegenerativního onemocnění v pozdějším věku. Považujeme tedy za důležité, aby se v budoucnosti testování rozšířilo o vyšetření na mutace v dalších genech, u kterých se potvrdí, že jsou odpovědné za rozvoj neurodegenerativních onemocnění. Nebylo v našich možnostech zjistit kauzální mutaci genu, která byla zodpovědná za rozvoj spinocerebelární ataxie u tří štěňat heterozygotních na sledovanou mutaci v *ATP1B2* genu. My se můžeme vyjádřit pouze k vyšetřeným mutacím, ale to, že tři *ATP1B2* heterozygotní štěňata projevila známky onemocnění, může mít víc vysvětlení. Histologické výsledky dokumentují změny v nervových buňkách mozečku, nervových buněk v páteřní míše s doprovodnými změnami periferních nervů a svalových vláken kosterních svalů. U SDCA jsou změny popisované především v mozečku. V naší studii jsme zjistili jednak širší spektrum změn a jednak jsme dokumentovali vztahy mezi uvedenými změnami. Zjistili jsme, že hlavní změna spočívá v degeneraci nervových buněk mozečku a míchy a ostatní změny jsou pouze doprovodnými projevy. Vzorky kostí nebyly sice v průběhu pitvy odebrány, ale změny v jejich konzistenci si primárně vysvětlujeme poruchou metabolismu minerálů, v které mohlo sehrát jistou úlohu i narušení homeostázy draslíku. V naší studii uvádíme pozdější nástup příznaků u tří *ATP1B2* heterozygotů, které diagnosticky odpovídaly SDCA. V jedné starší studii u sedmi Anglických Špringršpanělů trvaly neurologické klinické příznaky 6 měsíců až 4 roky. Příznaky se postupně zhoršovaly, až se psi dokázali nakonec jen

plazit ve skrčeném postoji. Nicméně histologicky zjištěné změny byly srovnatelné s našimi nálezy.¹¹ Jiná studie na podkladě 35 psů Jack Russel Teriérů, s anamnesticky námi podobnou neurologickou symptomatologií, dokázala změny charakteru axonopatie v celé CNS.¹² Podobně v populaci Skotských Teriérů, bylo popsáno hereditární degenerativní onemocnění s histopatologicky verifikovanými změnami Purkyňových buněk mozečku.¹³ Za zvláštní tedy nepovažujeme pozdější nástup neurologické symptomatologie, ale spojitost mezi *ATP1B2* heterozygoty a nástupem SDCA. V práci Aglera et al.¹⁴ se na podkladu skupiny psů Bobtail a Gordonsetr s ataxií již uvádí, že za změnami stojí mutace v *RAB24* genu. V práci Formana et al.¹⁵ bylo cíleně zjištěno, že mutace v *ITPR1* genu je v úzkém vztahu s predispozicí spinocerebelární ataxie Italského Spinone. Byl publikován vztah mezi mutací *SNX14* genu a degenerací mozečku Maďarských ohařů.¹⁶ Letko et al.¹⁷ poukazují na vztahy mezi spinocerebelární ataxií a mutací *SCN8A* genu, který se uplatňuje ve funkčnosti sodíkových kanálů a schopností buněk generovat, přenášet signály. Práce autorského kolektivu Wanga et al.¹⁸ dokonce dokázala, že mutace v *CAPN1* genu vede k vývoji spinocerebelární ataxie u myši i lidí. Na jiných živočiších nebyly projevy mutace uvedeného genu zatím ověřované. Proto by možná bylo vhodné zjistit, zda výše uvedené geny mají nějaký význam v rozvoji cerebelární ataxie i u Malinois varianty Belgického ovčáka. Bylo totiž zjištěno, že mutace v jednom genu se nemusí projevit stejně u různých živočišných druhů.¹⁹ Identifikace mutací v jednotlivých genech zodpovědných za SDCA by na jedné straně mohla přinést nový pohled na vznik a progresi spinocerebelární ataxie psů²⁰ a na druhé straně otevřít i cestu genové terapii u tohoto onemocnění, které je v současnosti neléčitelné. Dáváme tedy čtenářům na zvážení, zda by z diagnostického hlediska bylo vhodné zavést testování pro všechny identifikované mutace genů, které budou v budoucnu spojeny se vznikem a progresí SDCA a postupně jich aplikovat u všech našich chovných Belgických ovčáků Malinois.

Závěr

Naše studie popisuje vznik a vývoj spinocerebelární ataxie tří štěňat varianty Malinois Belgického ovčáka, u kterých byla nalezena známá mutace v *ATP1B2* genu v heterozygotní formě. Onemocnění odpovídalo svými klinickými projevy i histologickým nálezem SDCA, jen byl jeho nástup oproti nositelům mutace v genu *ATP1B2* v homozygotní formě opožděn. Odborná veřejnost by při pozorování neurologické symptomatologie měla u Belgických vlčáků varianty Malinois myslet na SDCA a doporučit provedení testů na důkaz známých mutací v genech *KCNJ10* a *ATP1B2*. Náš případ dokumentuje, že část našich chovných Belgických ovčáků varianty Malinois jsou přenašeči neurodegenerativních onemocnění s dosud neobjasněným genetickým podkladem. Dokud nebudou nalezeny mutace ve všech genech, které jsou odpovědné za vývoj spinocerebelární ataxie, není možné s jistotou odpovědět kolik našich chovných

Belgických ovčáků je přenašečů neurodegenerativních onemocnění a eliminovat tak výskyt SDCA v chovu.

Dedikace

Práce nebyla podpořena žádným grantem a všechny nákladové položky byly hrazené autory.

Literatura

1. KLEITER, M., HÖGLER, S., KNEISSL, S., LESCHNIK, M. Spongy degeneration with cerebellar ataxia in Malinois puppies: a hereditary autosomal recessive disorder? *J Vet Int Med* 2011;25:490-496.
2. MAURI, N., KLEITER, M., LESCHNIK, M., ET AL. A MISSENSE Variant in *KCNJ10* in Belgian Shepherd Dogs Affected by Spongy Degeneration with Cerebellar Ataxia (SDCA1). *G3 Bethesda* 2017;7:663-669.
3. MAURI, N., KLEITER, M., LESCHNIK, M., ET AL. A SINE Insertion in *ATP1B2* in Belgian Shepherd Dogs Affected by Spongy Degeneration with Cerebellar Ataxia (SDCA2). *G3 Bethesda* 2017;7:2729-2737.
4. URKASEMSIN, G., OLBÝ, N. J. Canine hereditary ataxia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014;44:1075-89.
5. MAKOVICKÝ, P. What does modern veterinary pathology have to offer? *ARC J Anim Vet Sci* 2015;1:43-47.
6. MAKOVICKÝ, P., ARNONE, J. M., MKOVICKÝ, P. Step by step in anatomic and diagnostics veterinary pathology: How death teaches us about life. *ARC J Anim Vet Sci* 2016;2:30-36.
7. MAKOVICKÝ, P., ŠVECOVÁ, I. Veterinary pathology: the past, present and the future. *Phenogenomic Newsletter* 2016;2:22-23.
8. DONNER, J., KAUKONEN, M., ANDERSON, H., ET AL. Genetic panel screening of nearly 100 mutations reveals new insight into breed distribution of risk variants for canine hereditary disorders. *PLoS One* 2016;11:e0161005.
9. LEEB, T., MÜLLER, E. J., ROOSJE, P., WELLE, M. Genetic testing in veterinary dermatology. *Vet Dermatol* 2017;28:4.
10. IBASETA-BEJARANO, U., NARANJO, C., MARCO, P., PUMAROLA, M. Spongiform polyoencephalopathy/spongy degeneration of the brain's gray matter in a Malinois litter. *AVEPA* 2012;32:95-98.
11. HIGGINS, R. J., LECOUTERUR, R. A., KERNAGY, J. N., COATES, J. R. Late-onset progressive spinocerebellar degeneration in Brittany Spaniel dogs. *Acta Neuropathol* 1998;96:97-101.
12. WESSMANN, A., GOEDDE, T., FISCHER, A., ET AL. Hereditary ataxia in the Jack Russell Terrier—clinical and genetic investigations. *J Vet Intern Med* 2004;18:515-21.
13. URKASEMSIN, G., LINDER, K. E., BELL, J. S., DE LAHUNTA, A., OLBÝ, N. J. Hereditary cerebellar degeneration in Scottish terriers. *J Vet Intern Med* 2010;24:565-70.
14. AGLER, C., NIELSEN, D. M., URKASEMSIN, G., ET AL. Canine hereditary ataxia in old english sheepdogs and gordon setters is associated with a defect in the autophagy gene encoding *RAB24*. *PLoS Genet* 2014;10:e1003991.
15. FORMAN, O. P., DE RISIO, L., MATIASEK, K., PLATT, S., MELLERSH, C. Spinocerebellar ataxia in the Italian Spinone dog is associated with an introgressive GAA repeat expansion in *ITPR1*. *Mamm Genome* 2015;26:108-17.
16. FENN, J., BOURSNELL, M., HETTI, R. J., ET AL. Genome sequencing reveals a splice donor site mutation in the *SNX14* gene associated with a novel cerebellar cortical degeneration in the Hungarian Vizsla dog breed. *BMC Genet* 2016;17:123.
17. LETKO, A., DIETSCHI, E., NIEBURG, M., ET AL. A Missense Variant in *SCN8A* in Alpine Dachsbracke Dogs Affected by Spinocerebellar Ataxia. *Genes (Basel)* 2019;10:E362.
18. WANG, Y., HERSHESON, J., LOPEZ, D., ET AL. Defects in the *CAPN1* Gene Result in Alterations in Cerebellar Development and Cerebellar Ataxia in Mice and Humans. *Cell Rep* 2016;16:79-91.
19. VAN POUCKE, M., STEE, K., SONCK, L., ET AL. Truncating *SLC12A6* variants cause different clinical phenotypes in humans and dogs. *Eur J Hum Genet* 2019;27:1561-1568.
20. JENKINS, C. A., KALMAR, L., MATIASEK, K., ET AL. Characterisation of canine *KCNIP4*: A novel gene for cerebellar ataxia identified by whole-genome sequencing two affected Norwegian Buhund dogs. *PLoS Genet* 2020;16:e1008527.

Adresa autorky:

Petra Žáková

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4 – Krč

e-mail: petazak@gmail.com